

平成 30 年 6 月 10 日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09148

研究課題名(和文)慢性心不全における貧血と炎症に交感神経と酸化ストレスは関与するか

研究課題名(英文)The role of inflammation and oxydative stress in the development of anemia in chronic heart failure

研究代表者

辻野 健 (Tsuji no, Takeshi)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号：90283887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：慢性心不全患者における貧血・好中球の増加・リンパ球の減少の発症機序を明らかにするために、食塩負荷により心不全を発症し、貧血と好中球増加・リンパ球減少を発症するDahl食塩感受性高血圧(DS)ラットを用いて実験を行った。その結果、貧血の原因は赤血球半減期の短縮であり、溶血により生じた遊離ヘモグロビンが腎障害をきたす可能性が示唆された。また、慢性心不全患者における腎機能障害が白血球分画異常の原因になると考え、アデニン負荷腎障害モデルマウスで検討したところ、インドキシル硫酸が骨髄における白血球分化の異常を介して好中球の増加・リンパ球の減少をきたしていることが示された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanisms of development of anemia and leukocyte abnormality in chronic heart failure, we performed animal experiments using Dahl salt-sensitive (DS) rats, in which high-salt diet induces hypertension, heart failure, anemia, and an increase in neutrophil/lymphocyte ratio (NLR). We found shortened half-life of red blood cell is the main cause of anemia in DS rats, and free hemoglobin released from red blood cell might cause renal damage. We also performed animal experiments using adenine-induced nephropathy model of mouse. We found elevated serum indoxyl sulfate induces increase in NLR by distortion of leukocyte hematopoiesis in bone marrow.

研究分野：循環器内科学

キーワード：慢性心不全 貧血 心腎貧血症候群 インドキシル硫酸

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性心不全において貧血は予後不良の重要な因子である。

慢性心不全はあらゆる心臓病の終末像であり、高齢化社会を迎えその患者は急増している。様々な治療薬の進歩により、その生命予後はある程度改善したが、高齢者の心不全患者は入退院を繰り返すことから医療費を著しく圧迫するようになることが予想される。とくに高齢の慢性心不全患者には貧血が高率に合併し、それが再入院と強く関連することから、心不全患者の再入院予防のためのターゲットとして貧血が注目された。

(2) 慢性心不全には貧血のみならず白血球系の異常が存在する。

心不全患者における貧血の成因は、体液貯留による循環血漿量の増加、炎症性サイトカインによる骨髄造血反応の低下、慢性腎臓病合併によるエリスロポエチン分泌の低下、鉄吸収・利用障害、栄養不良などと推測されてきたが、基礎的な検討はきわめて乏しかった。高血圧性心不全のモデル動物であるダール食塩感受性高血圧 (DS) ラットは心不全が進行すると貧血を呈し、それは慢性心不全患者と極めて類似している。我々は慢性心不全患者の血液サンプルと DS ラットを用いて、慢性心不全に合併する貧血には以下の特徴があることを示してきた (J Hypertens 2011;29:741-8, 第 18 回日本心不全学会)。すなわち、① 鉄欠乏状態にあるにも拘らず小球性低色素性貧血を呈さない ② 血中エリスロポエチン濃度は高値を示す ③ 鉄補充をしても貧血は改善せず、鉄の利用障害がある ④ 脾臓で髄外造血が行われている ⑤ ヘプシジンは鉄吸収を抑制するペプチドホルモンであり、慢性炎症に伴う鉄利用障害の主役であると考えられている。心不全でヘプシジンは低値を示すので、ヘプシジン高値が鉄利用障害の主因ではない などである。これらの特徴は⑤を除けば慢性炎症による貧血にきわめて類似している。これらの検討の過程で、我々は DS ラットにおいて、骨髄の脂肪細胞 (白く空胞状に抜けて見える) が減少し有核細胞数がむしろ増加していること、末梢血では好中球や単球の比率が増加しリンパ球の比率が減少していることを見出した。

(3) 慢性心不全における貧血と炎症を骨髄異常として包括的に理解することが必要である。

老化に伴って好中球や単球のような骨髄球系の細胞が増加し、リンパ球が減少することが知られている (myeloid skewness)。好中球や単球のような骨髄球系の白血球は炎症を惹起しやすいので、加齢に伴う軽度の炎症状態の原因になり、動脈硬化や発がんの素地になるという仮説が唱えられている。慢性心不全患者も軽度の炎症状態にあること、リ

ンパ球の減少が不良な予後と相関するなど、老化に類似した表現型をとる。しかし、老化においても慢性心不全においても、骨髄の異常が生じるメカニズムは十分明らかになっていない。

慢性心不全患者の貧血は予後不良のサインなので、それらは治療のターゲットと考えられた。しかしエリスロポエチンを用いて貧血を治療する試みは有効性を示すことはできなかった。むしろ貧血だけでなく炎症とともに骨髄異常としてその発症機序を明らかにし、より上流に介入することにより、新たな展開が期待できる。我々は DS ラットを用いて、慢性心不全における骨髄異常を包括的に理解し、新しい治療法の開発につなげたい。そのために以下の仮説を証明することが本研究の目的である。

## 2. 研究の目的

(1) CAR 細胞の異常が慢性心不全における骨髄異常の原因であるかどうかを検討すること

造血幹細胞はニッチと呼ばれる微小環境の中で自己複製を続けながら各血球系に分化していくことを一生続けていく。ニッチを構成する細胞が何かについては諸説あるが、現在最も確実視されているのは CAR (CXCL12-abundant reticular) 細胞である。この細胞は骨芽細胞・脂肪細胞前駆細胞であり、造血幹細胞の維持に必須である CXCL12 と stem cell factor (SCF) を高発現し、骨髄内で多くの造血幹細胞と接着している。CAR 細胞欠損マウスでは造血幹細胞が半分に減少し、B 前駆細胞と赤血球前駆細胞が著減する (Trends Immunol 2011;32:315-20.)。前述の通り、DS ラットでは赤血球とリンパ球が減少し、骨髄の脂肪細胞数が減少している。さらに骨量も減少しており、骨芽細胞の不足も示唆される。これらの異常は CAR 細胞の減少もしくは機能異常が存在することを強く示唆する。我々はまず、DS ラットで CAR 細胞の減少や機能異常があるのか (CXCL12 や SCF の低下など) を検討する。

(2) 赤血球半減期の短縮が臓器障害に与える影響の検討

貧血の原因を調べるうちに、貧血の原因が赤血球半減期の短縮であることが明らかになった。赤血球の破壊が亢進すれば、そこから遊離されたヘモグロビンや鉄による臓器障害が起こりうる。特に遊離ヘモグロビンは糸球体から濾過された後、近位尿管で再吸収され尿管障害を起こすことが輸血モデルで知られている。DS ラットにおいて貧血と臓器の鉄沈着の間に関連があるのかどうかを検討する。

(3) 酸化ストレスが慢性心不全における骨髄異常に関与するかどうかを検討すること  
造血幹細胞のニッチは低酸素状態にあり、

そのことが造血幹細胞を酸化ストレスから守り、生涯にわたる自己複製を可能にしていると考えられる。活性酸素は造血幹細胞の骨髄球系への分化を促進し、リンパ球系への分化を抑制することが知られている (Blood. 2007;110:3056-3063)。慢性心不全は酸化ストレス状態にあり、活性酸素が白血球系の異常に関与している可能性がある。また慢性腎不全では赤血球の半減期の短縮があり貧血の原因の一つになっているが、その原因の一つに酸化ストレスの関与が知られている。慢性心不全において酸化ストレスが貧血の原因になっているのか、なっているとすればそれは CAR 細胞の機能不全や炎症を介してなのか、それとも直接赤芽球や赤血球に作用して貧血を起しているのかを検討する。しかしラットを用いた実験では白血球表面マーカーが少なく、詳細な検討は困難であるので、マウスを使用したモデルで検討する。

### 3. 研究の方法

(1) DS ラットにおける CAR 細胞の異常、造血系の異常の検討

以下のような手順でモデルを作成した。

- ① Dahl 食塩感受性ラット (DS: n=100, ♂) を 4 週齢で入荷する。
- ② 6 週齢にて tail-cuff 法による血圧測定、体重測定の後 5 群に分ける。
  - ・LS 群 (n=20) : 常食を続ける。
  - ・HS 群 (n=20) : 6 週齢で 8%NaCl 食を開始する。
- ③ 8 週齢から 2 週間毎に tail-cuff 法による血圧測定、体重測定を行う。
- ④ 14 週齢にケタミン (50mg/kg) + キシラジン (10mg/kg) に採材し、検討を行った。その後以下の検討を行う。

(2) 赤血球半減期の検討

(1) と同様に LS 群と HS 群を作成し、14 週齢で各群 10 匹ずつ、Sulfo-N-hydroxysuccinimide-biotin (膜表面のタンパク質に結合しビオチン化する試薬) を 3 日連続尾静脈から静脈注射し、赤血球をラベリングする。その後 3~4 日毎に尾静脈から 100  $\mu$ l 採血し、avidin-fluorescein isothiocyanate antibody (BD Biosciences) を用いてラベルされた赤血球を FACS でカウントし、赤血球の半減期を求めた。

(3) Eryptosis の検討

DS ラットから採取した血液において、赤血球表面上の Phosphatidylserine (PS) の発現を Annexin-V-FITC でラベリングし、FACS で検討した。

(4) 赤血球半減期の短縮が臓器障害に与える影響の検討

以下のような検討を DS ラットで行った。

- ① 赤血球の破壊が遊離ヘモグロビンの増加をきたしているかどうかを血中ハプトグロ

ビン濃度で検討した。

- ② 腎臓への鉄沈着を鉄染色で検討した。
- ③ 鉄の鉄キレート剤デフェラシロクスやハプトグロビンが腎臓への鉄沈着を抑制できるかどうかを検討した。

(5) アデニン負荷腎障害モデルマウスにおける白血球分画異常の検討

ラットではマウスやヒトのように白血球の細胞表面マーカーが乏しく、骨髄における白血球分化の異常を検討することができなかった。そこでマウスでの検討を行った。アデニンは 2,8 ジヒドロキシアデニンに代謝され、近位尿細管に沈着・結晶化し腎障害を引き起こすことが知られている。アデニン負荷腎障害モデルマウスは慢性腎不全のモデルである。このモデルで腎機能障害が骨髄での白血球分化の異常をきたし、末梢血の白血球分画の異常を引き起こすかどうかを検討した。そして骨髄細胞中の myeloid progenitor、common lymphoid progenitor の比率について検討した。さらに尿毒症物質インドキシル硫酸の影響を検討するため、球形活性炭 AST-120 を投与した。

### 4. 研究成果

(1) DS ラットにおける CAR 細胞の異常、造血系の異常の検討

CAR 細胞は造血幹細胞の維持に必須である CXCL12 を分泌する。CAR 細胞を欠損させると貧血と B 細胞の減少が見られることが知られている。食塩負荷を受けた HS 群において、LS 群よりも骨髄における CXCL12 の mRNA は減少していたが、ELISA 法で検討した CXCL12 量の減少は見られなかった。故に、CAR 細胞の異常/CXCL12 の減少が貧血やリンパ球減少の原因ではない様であった。さらに HS 群において骨髄中の赤芽球系細胞 (HIS49 陽性細胞) は LS 群よりも増加しており、造血の低下が貧血の原因ではないと考えられた。

(2) DS ラットにおける赤血球半減期の検討

DS ラットにおいて赤血球半減期を調べたところ、HS 群では LS 群よりも赤血球半減期が短縮し、赤血球半減期と Hb 値が強く関連していた。このことから、DS ラットの心不全に合併する貧血の原因は赤血球半減期の減少であることが明らかになった。さらに、DS ラットは血清鉄が低下しているが、エリスロポエチンや鉄剤を投与しても貧血に対する効果は全くなく、エリスロポエチン不足や鉄不足は貧血に関与しないことを明らかにした。

以上の検討から、当初貧血の原因は当初考えていたように骨髄の赤血球産生低下ではなく、赤血球半減期短縮であることが明らかになり、研究の方向性を大きく転換することになった。

(3) DS ラットにおける eryptosis の検討

Eryptosis は核なき細胞である赤血球の apoptosis であり、apoptosis と同様に細胞表面に phosphatidylserine (PS) が現れる。赤血球表面の PS を Annexin-V-FITC で検討したところ、HS 群では eryptosis を起こしている赤血球の増加が見られた。このことから、eryptosis の増加が赤血球半減期短縮の原因であると考えられた。

#### (4) 赤血球半減期の短縮が臓器障害に与える影響の検討

HS 群では、LS 群と比較して、赤血球半減期の短縮に伴い血清ハプトグロビン濃度低下、肝臓でのハプトグロビン mRNA の増加と近位尿細管の鉄沈着が見られ、溶血により生じた遊離ヘモグロビンが近位尿細管に沈着していると考えられた。さらに鉄キレート剤デフェラシロクスを投与することにより、近位尿細管への鉄沈着を抑制し、近位尿細管の障害（電子顕微鏡で評価）を抑制することができた。しかしハプトグロビンの投与では近位尿細管への鉄沈着を抑制することができず、遊離ヘモグロビンが沈着したのかそこから遊離した鉄が直接沈着したのかは更なる検討が必要である。

#### (5) アデニン負荷腎障害モデルマウスにおける白血球分画異常の検討

アデニン負荷腎障害モデルマウスでは腎機能が障害され、末梢血の好中球が増加しリンパ球が減少した。そして腎障害マウスでは骨髓細胞中の myeloid progenitor が増加し、common lymphoid progenitor が減少した。さらに血中の尿毒症物質インドキシル硫酸を測定したところ、腎障害マウスでは血中インドキシル硫酸が上昇しており、球形活性炭 AST-120 を投与したところ、血中インドキシル硫酸は低下し、末梢血中の好中球増加・リンパ球減少も改善した。インドキシル硫酸は酸化ストレスを介して様々な病態形成に関与することが知られている。この結果は慢性心不全における好中球増加・リンパ球に腎機能の低下が関与していることを強く示唆するものであった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Naito Y, Sawada H, Oboshi M, Okuno K, Yasumura S, Okuhara Y, Eguchi A, Nishimura K, Soyama Y, Asakura M, Ishihara M, Tsujino T, Masuyama T. Altered expression of intestinal duodenal cytochrome b and divalent metal transporter 1 might be associated with cardio-renal anemia syndrome. *Heart Vessels*. 2017 Nov; 32(11): 1410-1414. doi: 10.1007/s00380-017-1013-4. Epub 2017 Jul 1.

② Oboshi M, Naito Y, Sawada H, Iwasaku T, Okuhara Y, Eguchi A, Hirotsu S, Mano T, Tsujino T, Masuyama T. Attenuation of hypertension and renal damage in renovascular hypertensive rats by iron restriction. *Hypertens Res*. 2016 Dec; 39(12):832-839. doi: 10.1038/hr.2016.93. Epub 2016 Jul 21.

[学会発表] (計 7 件)

① 伊藤都裕、辻野健. 球形吸着炭 (AST-120) は、慢性腎臓病による好中球/リンパ球比の増加を抑制する. 日本薬学会第 138 年会、2018 年

② 康村誠希、内藤由朗、奥野圭佑、大星真貴子、辻野健、増山理. 腎線維化病変における鉄の関与. 第 40 回日本高血圧学会総会、2017 年

③ 伊藤都裕、坂本淳一、高本光次郎、真鍋恵理、増山理、辻野健. 慢性腎臓病は白血球分画異常を引き起こす. 第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2017 年

④ Yasumura S, Naito Y, Oboshi M, Okuno K, Okuhara Y, Ando T, Nishimura K, Orihara Y, Asakura M, Masuyama T. Intestinal iron transporters in cardio-renal anemia syndrome. 第 21 回日本心不全学会学術集会、2017 年

⑤ Manabe E, Ito S, Tsujino T, Masuyama T. Reduced half-life of erythrocytes in Dahl/Salt sensitive rats is the cause of the renal proximal tubule damage. 第 81 回日本循環器学会学術集会、2017 年

⑥ 真鍋恵理、佐々木尚子、大野喜也、田中稔之、伊藤都裕、増山理、辻野健. 慢性心不全モデルラットの貧血の原因は赤血球半減期の短縮である. Reduced half-life of red blood cells causes anemia in the model of hypertensive chronic heart failure. 第 20 回日本心不全学会学術集会、2016 年

⑦ 内藤由朗、大星真貴子、澤田悠、辻野健、増山理. 高血圧患者における食事性鉄制限の有用性の検討. 第 39 回日本高血圧学会総会、2016 年

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

辻野 健 (TSUJINO, Takeshi)  
兵庫医療大学・薬学部・教授  
研究者番号: 90283887

##### (2) 研究分担者

内藤 由朗 (NAITO, Yoshiro)

兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号：10446049

増山 理 (MASUYAMA, Tohru)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70273670